

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/38769 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/37,
15/84, 15/85, 5/10, C07K 14/025, A61K 39/12, 48/00

Quedlinburg (DE). **BIEMELT, Sophia** [DE/DE]; Pölle
38, 06484 Quedlinburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03618

(74) **Anwalt: HUBER, Bernard**; Huber & Schüssler, Trud-
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. September 2001 (19.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 55 545.4 9. November 2000 (09.11.2000) DE

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS**
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
(DE). **IPK, INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK
UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG** [DE/DE];
Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes",
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Mar-
tin** [DE/DE]; Siedlerweg 2, 69151 Neckargemünd
(DE). **LEDER, Christoph** [DE/DE]; Woerthstrasse 12,
69115 Heidelberg (DE). **KLEINSCHMIDT, Jürgen**
[DE/DE]; Weihwiesenweg 5, 69245 Bammertal (DE).
SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484

(54) **Title:** DNA SEQUENCES, WHICH CODE FOR OPTIMISED EUKARYOTIC HPV 16-L1 AND HPV 16-L2

(54) **Bezeichnung:** FÜR EXPRESSION IN EUKARYONTEN OPTIMIERTE HPV 16-L1 UND HPV 16-L2 KODIERENDE DNA-
SEQUENZEN

(57) **Abstract:** The invention relates to DNA sequences that have been optimised with respect to the codon use, said sequences
coding for an HPV 16-L1 capsid protein or an HPV 16-L2 capsid protein. Said DNA sequences comprise the DNA sequences or
fragments or variants thereof that are illustrated in figures 5, 6 or 7 and permit the simple recombinant production of HPV 16-L1 or
HPV 16-L2 capsid proteins or fragments thereof in high yields, without having to use viral vectors. The capsid proteins are preferably
used for producing vaccines.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben werden hinsichtlich der Codon-Verwendung optimierte DNA-Sequenzen, die ein HPV
16-Kapsidprotein L1 bzw. HPV 16-Kapsidprotein L2 kodieren. Diese DNA-Sequenzen umfassen die in den Figuren 5, 6 oder
7 gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmente oder Varianten dieser DNA-Sequenzen und erlauben die einfache rekombinante
Herstellung von HPV 16-L1- bzw. L2-Kapsidproteinen oder Fragmenten davon mit hoher Ausbeute unter Vermeidung der
Verwendung viraler Vektoren, vorzugsweise zur Herstellung von Vakzinen.

BEST AVAILABLE COPY

3

WO 02/38769 A2

Für Expression in Eukaryonten optimierte HPV 16-L1 und HPV 16-L2 kodierende DNA Sequenzen

Die vorliegende Erfindung betrifft hinsichtlich der Codon-Verwendung optimierte DNA-Sequenzen, die für ein HPV 16-Kapsidprotein L1 bzw. HPV 16-Kapsidprotein L2 kodieren. Diese DNA-Sequenzen umfassen die in den Figuren 5, 6 oder 7 gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmente oder Varianten dieser DNA-Sequenzen. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen erlauben die einfache rekombinante Herstellung von HPV 16-L1- bzw. L2-Kapsidproteinen oder Fragmenten davon mit hoher Ausbeute unter Vermeidung der Verwendung viraler Vektoren, vorzugsweise zur Herstellung von Vakzinen.

Ein Teil der humanen Papilloma-Virus(HPV)-Typen ist für den Menschen relativ harmlos (z.B. HPV 1), während andere Typen humaner Papillomaviren eng mit der Entwicklung maligner Tumoren assoziiert sind. Besonders gut charakterisiert ist deren Beteiligung an der Entstehung des Zervixkarzinoms und verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß HPVs eine kausale Ätiologie dieses Tumors spielen. Auf der molekularen Ebene sind in etwa 95% der Zervixkarzinom-Biopsien Sequenzen onkogener HPV-Typen (HPV 16 in etwa 50-60% und HPV18 in etwa 10-20% der Fälle) nachweisbar. Die rekombinante Gewinnung von HPV-Kapsidproteinen, z.B. HPV 16-L1 oder HPV 16-L2, ist daher für die Herstellung von entsprechenden Vakzinen im kommerziellen Maßstab von großer Bedeutung. Allerdings ist es seit längerer Zeit bekannt, daß die Expression von HPV-Kapsidproteinen in höheren eukaryontischen Zellen, z.B. Säugetierzellen, ohne Verwendung bestimmter viraler Vektoren, wie Vakzinia Virus, Semliki Forest Virus (SFV), Adenovirus etc. praktisch nicht möglich ist. Es ist davon auszugehen, daß ein Grund dafür darin liegen dürfte, daß Papillomaviren Strategien entwickelt haben, die vorzeitige Expression der sehr immunogenen Kapsidproteine im Wirt zu vermeiden. Es wurden zwar bisher verschiedene Mechanismen, die dieser

geringen Expression zugrunde liegen könnten diskutiert, z.B. sogenannte negativ-regulatorische Elemente auf der mRNA, allerdings konnte bisher keine der Hypothesen experimentell bestätigt werden. Auch durch Einsatz von mRNA-Export-Elementen war bisher nur eine geringe Expression von z.B. HPV16-L1 möglich. Durch die deshalb bedingte Notwendigkeit der Verwendung viraler Expressionssysteme wurde die bisherige Verwendungsmöglichkeit der vorstehenden HPV-Kapsidproteine für die Vakzine-Herstellung stark eingeschränkt.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, DNA-Sequenzen bereitzustellen, die eine einfache und hocheffiziente rekombinante Herstellung der HPV16-Kapsidproteine L1 und L2 erlauben.

Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Es zeigte sich, daß durch einen Austausch bestimmter Codons in der HPV 16-L1 bzw. HPV 16-L2 kodierenden DNA-Sequenz unter Beibehaltung der ursprünglichen Aminosäuresequenz die Expression in höheren eukaryontischen Zellen sehr stark verbessert werden kann, wobei auch nicht länger der Einsatz von viralen Vektoren erforderlich ist. In den zu der vorliegenden Erfindung führenden Experimenten wurden die HPV 16-L1 und -L2 kodierenden DNA-Sequenzen vollständig neusynthetisiert, wobei dazu überlappende 85mer Primer verwendet und die entsprechenden DNA-Sequenzen (ohne Matrize) über PCR hergestellt wurden. Es wurden für L1 kodierende neue DNA-Sequenzen hergestellt, die für die Expression in Pflanzen und Säugerzellen optimiert worden waren und eine für L2 kodierende neue DNA-Sequenz, die ebenfalls für die Expression in Säugerzellen optimiert worden war. Dabei wurden mehr als 60% aller Codons verändert. Die Expression erfolgte in dem Vektor pUF3 unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus "immediate early promoters" (pCMV), wobei es sich zeigte, daß

alle Konstrukte eine wesentlich bessere Expression zeigten im Vergleich zu den Ausgangs-DNA-Sequenzen, wobei eine Erhöhung der Expressionsrate bis zu einem Faktor von 10000 gefunden wurde. Desweiteren wurde gefunden, daß eine derart hohe
5 Expression auch erzielt wird, wenn das HPV16-L1 oder -L2 in Fusionsproteinen, z.B. mit E7 von HPV16 oder Teilen davon, vorliegt, wobei die DNA-Sequenzen der mit HPV16-L1 oder -L2 fusionierten Polypeptide in Wildtyp-Form vorliegen können.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine DNA-Sequenz, die für ein HPV 16-Kapsidprotein L1 kodiert und die in Figur 5 oder 6 gezeigte DNA-Sequenz umfaßt, oder für ein HPV 16-Kapsidprotein L2 kodiert und die in Figur 7 gezeigte DNA-Sequenz umfaßt.

15 Die vorliegende Erfindung umfaßt auch eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines HPV 16-Kapsidproteins L1 oder eines HPV 16-Kapsidproteins L2 kodiert und die ein Fragment oder eine Variante der in Figur
20 5, 6 oder 7 gezeigten DNA-Sequenz ist.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "Fragment" umfaßt DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in den Figuren 5, 6 und 7 angegebenen DNA-Sequenzen dadurch
25 unterscheiden, daß sie nur einen Teil davon oder Teile davon umfassen, die jedoch noch Polypeptide mit einer biologischen Aktivität des von der Gesamtsequenz kodierten Proteins kodieren, wobei sich in diesem Zusammenhang der Begriff
30 "biologische Aktivität" vorzugsweise auf die Wirksamkeit als Vakzine bezieht. Der Fachmann kann mittels üblicher Verfahren solche Fragmente herstellen bzw. auswählen, die noch über diese Eigenschaft verfügen.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff
35 "Variante" umfaßt DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in den Figuren 5, 6 und 7 angegebenen DNA-Sequenzen dadurch unterscheiden, daß sie nicht alle der in den Figuren angegebenen veränderten Codons, d.h. weniger im Vergleich zu

den Ausgangs-DNA-Sequenzen veränderte Codons, also noch mehr WT-Codons enthalten. Dabei beträgt die Rate der gegenüber den ursprünglichen DNA-Sequenzen veränderten Codons mindestens 10-40%, vorzugsweise mindestens 50% und am meisten bevorzugt mindestens 55%. Diese Codonveränderungen führen nicht dazu, daß die Wirkung der davon translatierten Polypeptide als Vakzine wesentlich beeinträchtigt wird, vorzugsweise führen sie nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch mit weiteren DNA-Sequenzen fusioniert sein, die die Synthese von Fusionsproteinen bewirken, wobei diese Fusionsproteine neben HPV 16-L1 oder -L2 oder Teilen davon vorzugsweise ein weiteres HPV 16-Protein oder ein Teil davon, z.B. ein Kapsidprotein oder ein Strukturprotein, wie E7, umfassen, was u.U. zu einer verbesserten Vakzine führen kann. Günstig kann es sein, wenn das HPV16-L1 oder -L2 kein Kernwanderungssignal (NLS) aufweist, daß ein solches dann z.B. in Form jenes von SV40, im Fusionsprotein vorliegt. Bevorzugte Fusionsproteine sind HPV16-L1 human delta C E7 1-60, HPV16-L1 human delta C NLS-E7 (short) und HPV16-L1 human delta C NLS-E7 (long). Es wird auf die Figuren 8 - 10 verwiesen.

Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der DNA-Sequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Der Fachmann ist auch in der Lage, zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten DNA-Sequenz kodiertes Protein noch über die biologischen Eigenschaften des Ausgangsproteins verfügt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese DNA-Sequenzen enthaltende Vektoren bzw. Expressionsvektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pBR322, pBlueScript, pGEMEX,

pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, etc.) oder ein anderes geeignetes Vehikel.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression, vorzugsweise in höheren eukaryontischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen
10 Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryonten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in
15 Eukaryonten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RVS-40, MMTV- oder Metallothionein I-Promoter für die Expression in tierischen Zellen, insbesondere Tieren. Als Vektoren für letztere Expression eignen sich z.B. pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, insbesondere pUF3. Bevorzugt liegen
20 die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in einem Expressionsvektor, z.B. pUF3 (Zolotukhin et al., J. Virol. Vol. 70, (1906), 4646-4654) unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus "immediate early" Promoters (pCMV) vor. Ferner können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in einen AAV-
25 Vektor, z.B. der Serotypen AAV1-6, wobei AAV2 bevorzugt ist, inseriert sein, wodurch z.B. eine Vakzinierung über die Mund/Rachen-Schleimhäute ermöglicht ist, was u.U. zur Induktion von anti-HPV16-L1 bzw. -L2 IgA Antikörper führt. Desweiteren können auch andere Viren oder abgeschwächte bzw.
30 inaktivierte Bakterien als Vektor für die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen verwendet werden. Solche sind z.B. Vakzinia Viren, Herpes Simplex Viren oder Adenoviren bzw. Salmonellen oder Listerien. Darüberhinaus zählen zu den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren auch von Baculovirus abgeleitete Vektoren
35 für die Expression in Insektenzellen, beispielsweise pAcSGHisNT-A.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die

erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in pflanzlichen Zellen, insbesondere in Pflanzen exprimiert. Hierfür können übliche Vektoren, wie pUC-Derivate, verwendet werden, die für pflanzliche Zellen geeignete regulatorische Elemente
5 enthalten. Solche Elemente umfassen z.B. Promotoren, wie den Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor, den Agrobacterium tumefaciens Nopaline Synthase Promotor und den Mannopine Synthase Promotor, und Enhancer, wie den TMV-Overdrive-Enhancer. Sollten aus den transfizierten pflanzlichen Zellen
10 ganze Pflanzen regeneriert werden, ist es günstig, wenn ferner ein selektierbarer Marker, wie das Neomycinphosphotransferase II-Gen aus E.coli, das Sulfonamid-Resistenzgen oder das Hygromycin-Resistenzgen vorliegt.

15 Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in
20 vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend
25 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen vorzugsweise pflanzliche Zellen, insbesondere Zellen von Weizen, Gerste, Reis, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Brassicaceen, Leguminosen, Tabak, Kartoffel, Pilze, Moose und Algen, sowie tierische
30 Zellen, insbesondere Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293T-, 911- und WI38-Zellen. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch die aus den Wirtszellen generierbaren Wirte, insbesondere Pflanzen. Verfahren zur Transformation vorstehender
35 Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines HPV 16-Kapsidproteins L1 oder eines HPV 16-Kapsidproteins L2 , das die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen umfaßt, die die Expression des Proteins (bzw. Fusionsproteins) erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und die Gewinnung des Proteins aus der Kultur oder aus den Wirtszellen. Dem Fachmann sind Bedingungen bekannt, transformierte bzw. transfizierte Wirtszellen zu kultivieren. Geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind ebenfalls allgemein bekannt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in exprimierbarer Form, z.B. in rekombinanten AAVs, sowie mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen rekombinant hergestellten HPV 16-Kapsidproteine erlauben die einfache und kostengünstige Herstellung eines Vakzinierungsmittels gegen HPV 16-Infektionen, das gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung des Vakzinierungsmittels kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale, intranasale oder intraanale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter und dem Gewicht des Patienten, der Art der Verabreichung etc.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Vergleich der Expression von HPV 16 L1 - original (Llori), optimiert für Pflanzenexpression (pL1) und Expression in humanen Zellen (hL1) nach transienter Transfektion der entsprechenden Expressionsplasmide in humane Zellen

Extrakte der transfizierten Zellen (293T Zellen) wurden in SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem monoklonalen anti-L1 Antikörper nachgewiesen. Entsprechend den Angaben über der Figur wurden von Extrakt hL1 im Vergleich zu dem Extrakt von pL1 und Llori nur 1/10 bzw. 1/100 der Menge aufgetragen. Kontrolle: mock transfizierte Zellen. Llori: Original-Sequenz von HPV16-L1.

Figur 2: Direkte und indirekte Effekte der modifizierten Leserahmen

Um der Frage nachzugehen, ob die Codons oder regulatorische Elemente die Expression von L1 beeinflussen, wurden bicistronische Vektoren analysiert. (siehe bezüglich des schematischen Aufbaus der Vektoren den unteren Teil der Figur.) Hinter den jeweiligen L1-Genen befindet sich das eGFP-Gen, dessen Translation unabhängig von der L1-Translation von einer "internal ribosome binding site" (IRES) erfolgen kann. Ergebnis: Die eGFP-Expression wird vom jeweiligen vorgeschalteten L1-Gen beeinflusst. Kontrolle: mock transfizierte Zellen. Llori: Original-Sequenz von HPV16-L1.

Figur 3: HPV 16-L2-Expression durch Modifikation des Leserahmens

Die "Humanisierung" der Codons von L2 ermöglicht die Expression in Säugetierzellen (293T) nach transienter Transfektion. Die Figur zeigt die Ergebnisse eines Western-Blot mit Verwendung eines polyklonalen anti-L2-Antiserums. Kontrolle: mock transfizierte Zellen

Figur 4: Partikelbildung nach Expression von HPV 16-L1 in 911-Zellen

Die Figur zeigt die Bildung von Virus-artigen Partikeln (VLPs) nach transienter Expression von hL1 in humanen Zellen (911-Zellen). Die Zellen wurden 2 Tage nach der DNA-Transfektion fixiert, geschnitten und gefärbt. Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der VLPs im Zellkern einer transfizierten Zelle. A: Übersicht; B: stärker vergrößerter Bereich

Figur 5: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von pL1

Figur 6: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von hL1

Figur 7: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von hL2

Figur 8: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HPV 16-L1 human delta C E7 1-60 (AS 1-474 von HPV16-L1 und AS 1-60 von HPV16-E7)

Figur 9: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HPV 16-L1 human delta C NLS-E7 (short) (AS 1-474 von HPV16-L1, AS 1 und 2 von HPV16-E7, 7 AS von SV40 NLS und AS 11-60 von HPV16-E7)

Figur 10: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HPV 16-L1 human delta C NLS-E7 (long) (AS 1-474 von HPV 16-L1, AS 1 und 2 von HPV16-E7, 7 AS von SV40 NLS und AS 1-60 von HPV16-E7)

Figur 11: Immunisierung von Tieren mittels erfindungsgemäßer DNA-Sequenzen

Figur 12: Physikalische Karte des Pflanzenexpressionsvektors #945 HPV16-L1 h

**Figur 13: DNA-Sequenz der Expressionseinheit von #945
HPV16-L1 h**

Die Figur zeigt den 35S Promotor, den TMV-Overdrive-Enhancer und die Sequenz von HPV16-L1 h, die sich von jener von Fig. 6 durch das Codon GCC nach dem ATG-Startcodon gegenüber dem Codon AGC unterscheidet. Die DNA-Sequenz von HPV16-L1 h von Fig. 13 stellt ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

**Figur 14: Western Blot Analyse der Expression von HPV16-L1 h
in transgenen Tabakpflanzen**

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung der optimierten HPV 16-L1- und L2-DNA-Sequenzen

Zur Herstellung der optimierten Sequenzen wurde ein PCR Verfahren nach Kim et al., Gene 199, (1997), 293-301 verwendet. Hierzu wurden 85mer Oligonukleotide (jeweils 25 Primer für pL1 und hL1, 24 Primer für hL2) synthetisiert, die das HPV16-L1- bzw. -L2-Gen umfassen. Die Oligonukleotide überlappen in 20-23 Basenpaaren und sind alternierend vom kodierenden bzw. nicht kodierenden DNA Strang abgeleitet (z.B. 1: kodierend, 2: nicht kodierend, 3: kodierend, 4: nicht kodierend). Das hat zur Folge, daß die 5'-3' Richtung geradzahligiger Oligonukleotide entgegen der 5'-3' Richtung ungeradzahligiger Oligonukleotide verläuft. Für die PCR Synthese wurden zunächst jeweils Gruppen aus 4 Oligonukleotiden verwendet (1,2,3,4 und 3,4,5,6 und 5,6,7,8 etc). Das molare Verhältnis der innenliegenden Oligonukleotide (z.B. 2 und 3) zu den aussenliegenden Oligonukleotiden (z.B. 1 und 4) wurden auf 1:100 eingestellt. Durch anschließende PCR wurden doppelsträngige DNA Produkte erhalten, die die Bereiche der eingesetzten Primer enthielten (z.B. Produkt a: 1-4, Produkt b: 3-6 etc.). In einem zweiten Amplifikationszyklus wurden dann durch Verwendung der Produkte aus Runde 1 längere

doppelsträngige DNA Bereiche hergestellt. Dazu wurden beispielsweise Primer 1 und 6 mit den Produkten a und b der ersten Runde eingesetzt. Auf diese Weise wurden größere Bereiche der optimierten Gene hergestellt. Beim Design der rekombinanten Gene wurden die Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsendonukleasen eingeführt, ohne allerdings die Sequenz der kodierten HPV16-L1- bzw. -L2-Gene zu verändern. Diese Schnittstellen wurden bei der Synthese verwendet, um PCR Zwischenprodukte zu klonieren und deren Korrektheit mittels DNA Sequenzierung zu prüfen. Nach Zusammensetzen der Gene aus diesen Fragmenten wurde die Sequenz nochmals durch DNA-Sequenzierung überprüft (Tabelle 1: Codonstatistik für HPV 16-L1 and- L2).

Beispiel 2: Herstellung der Expressionsvektoren zur Expression von HPV16-pL1, HPV16-hL1 und HPV 16-hL2 in Säugerzellen.

Die in Beispiel 1 synthetisierten DNA-Sequenzen wurden in den Vektor pUF3 (Zolotukhin et al., supra) unter der Kontrolle des Cytomegalovirus "immediate early" Promotors (pCMV) inseriert. Hierzu wurden die Gene pL1, hL1 und hL2 zunächst über XbaI und HindIII (auf jeweils dem ersten bzw. letzten Primer) in pBluescript KS kloniert (pBKSpL1, pBKShL1, pBKShL2). Die erhaltenen Klone wurden bei der DMSZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen als E.coli #713; 16L1 plant Blspt (pL1) unter DSM 13745, als E.coli #835; 16L1 human Blspt (hL1) unter DSM 13746 bzw. als E.coli #886; 16L2 human Blspt (hL2) unter DSM 13747 am 28. Sept. 2000 hinterlegt. Desweiteren wurden die Gene pL1, hL1 und hL2 mit XbaI und HindIII aus den Vektoren ausgeschnitten und in pBKCMV über XbaI, HindIII kloniert. Aus den erhaltenen Vektoren wurden die Gene wiederum über NotI, SalI ausgeschnitten und in NotI, SalI gespaltenen pUF3 kloniert. Es wurden die Expressionsvektoren pUF3-pL1, pUF3-hL1 und pUF3-hL2 erhalten.

**Beispiel 3: Ergebnisse der Expression der erfindungsgemäßen
DNA-Sequenzen in humanen Zellen**

5 (a) Humane 293 T Zellen wurden einer transienten Transfektion mit den in Beispiel 2 hergestellten Expressionsvektoren pUF3-pL1, pUF3-hL1 und pUF3-hL2 unterzogen. Nach drei Tagen wurden aus den Zellen Extrakte gewonnen, einer SDS-PAGE unterzogen und in einem Westernblot mittels eines käuflichen monoklonalen anti-L1-Antikörpers nachgewiesen.

10 Es zeigte sich, daß durch die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen eine stark erhöhte Expression von HPV16-L1 erreicht wird (Fig. 1).

15 (b) Humane 293 T Zellen wurden einer transienten Transfektion mit einem bi-cistronischen Expressionsvektor unterzogen, der neben dem HPV16-L1-Gen auch ein dahinter liegendes eGFP-Gen enthält, dessen Translation von einer "internal ribosome binding site (IRES) erfolgt. Nach einem Tag wurde von einem Teil der Zellen eine FACS-Analyse durchgeführt. Von den restlichen Zellen wurden Extrakte gewonnen, einer SDS-PAGE unterzogen und in einem Westernblot mittels eines käuflichen monoklonalen anti-L1-Antikörpers nachgewiesen.

20 Es zeigte sich, daß durch die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen eine stark erhöhte Expression von HPV16-L1 erreicht wird, die genutzt werden kann, um eine weitere in cis vorliegende DNA-Sequenz ebenfalls hoch zu exprimieren (Fig. 2).

25 (c) Humane 293 T Zellen wurden einer transienten Transfektion mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor pUF3-hL2 unterzogen. Nach drei Tagen wurden aus den Zellen Extrakte gewonnen, einer SDS-PAGE unterzogen und in einem Westernblot mittels eines polyklonalen anti-L2-Serums nachgewiesen.

30

35

Es zeigte sich, daß durch die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen eine stark erhöhte Expression von HPV16-L2 erreicht wird (Fig. 3).

5 **Beispiel 4: Nach transienter Expression von hL1 in 911-Zellen werden Virus-artige Partikel (VLPs) gebildet**

911-Zellen wurden transient mit pUF3-hL1 DNA transfiziert.
10 Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und Ultradünnschnitte angefertigt, die einer elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen wurden.

Es zeigte sich, daß sich aus den erfindungsgemäßen DNA-
15 Sequenzen HPV16-L1-Kapside bilden.

Beispiel 5: Immunisierung von Tieren mittels erfindungsgemäßer DNA-Sequenzen

20 Um zu testen, ob eine erfindungsgemäße HPV16-L1-DNA-Sequenz eine humorale Immunantwort auslösen kann, wurden Mäuse mit pUF3-hL1 immunisiert. Die Mäuse wurden zweimal, im Abstand von vier Wochen mit je 100 Mikrogramm pUF3-hL1 intra-muskulär immunisiert. Vier Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde
25 Serum entnommen. Um Anti-HPV16-L1 spezifische Antikörper im Serum der Mäuse nachzuweisen, wurden ELISA-Platten mit gereinigtem HPV16-L1-Virus-artigen Partikeln (2,5 Mikrogramm/Vertiefung) beschichtet. Die Seren wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10-1:12800) getestet. Als
30 Negativkontrolle dienten ELISA-Platten, die nur mit PBS beschichtet waren. An die Platten gebundene HPV16-L1 spezifische Antikörper wurden durch einen Sekundär-Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Peroxidase) und entsprechender Peroxidase-vermittelter Farbreaktion nachgewiesen.

35

Es zeigte sich, daß Mäuse, die mit erfindungsgemäßigem pUF3-hL1 immunisiert wurden, große Mengen von HPV16-L1 spezifischen Antikörpern produzieren. Im Gegensatz dazu ist die Menge der

HPV16-L1 spezifischen Antikörper sehr gering, wenn Original-Sequenzen von HPV16-L1 verwendet werden.

Beispiel 6: Konstruktion des Pflanzenexpressionsvektors #945 HPV 16L1 h

Um das Gen HPV16-L1 h in den den TMV-Overdrive-Enhancer enthaltenden Vektor TMV-U1-Overdrive einzufügen, war es notwendig eine zusätzliche NcoI Restriktionsschnittstelle, überlappend mit dem ATG Initiationskodon des HPV16-L1 h Gens einzufügen. Dazu wurde mittels PCR der 5'Bereich von HPV16-L1 h amplifiziert. Folgende Primer wurden verwendet:

Primer:

HPV16-L1 h NcoP1:

TTTGAATTCCATGCCCTGTGGCTGCCCAGCG

HPV16-L1 h NcoP2:

TTTTAAGCTTCCATGGCGCCGAAGCCG

Die Primer enthalten folgende Elemente:

HPV16-L1 h NcoP1: EcoRI Schnittstelle zum Zwischenklonieren in pBlueskript; ATG Initiationscodon (fett) HPV16-L1 h überlappend mit neuer NcoI Schnittstelle (unterstrichen). Durch Einfügen der NcoI Schnittstelle wird die zweite Aminosäure von HPV16-L1 h in ein Alanin umgewandelt.

HPV16-L1 h NcoP2: HindIII Schnittstelle zum Zwischenklonieren in pBlueskript, Interne NcoI Schnittstelle, bereits in HPV16-L1 h enthalten.

Das PCR Produkt wurde zunächst in pBluescript kloniert und sequenziert. Parallel dazu wurde das Gen HPV16-L1 h in den Vektor TMV-U1-overdrive über SacI Sall einkloniert. Dieser Vektor enthält bereits den 35S Promoter sowie das Overdrive

Element:

Kpn1-35S-Od-Nco1 (aus Vektor)-Sac1-HPV16-L1 h-Nco1 (HPV16-L1 h-intern)-HPV16-L1 h-Sal1

5

Um HPV16-L1 h richtig in Bezug auf den Overdrive-Enhancer zu positionieren, wurde das erhaltene Konstrukt mit Nco1 geschnitten, der 5'Bereich des HPV16-L1 h entfernt und anschließend das zwischenklonierte PCR Fragment (s.o.) als Nco1 Fragment eingefügt. Schließlich wurde die Expressionskassette (Overdrive-HPV16-L1 h) mittels Kpn1-Sal1 ausgeschnitten und in den binären Pflanzenexpressionsvektor pBIN-AR eingefügt. Es wurde der Pflanzenexpressionsvektor #945 HPV16-L1 h erhalten.

15

Beispiel 7: Expression von HPV16-L1 h in transgenen Tabakpflanzen

1. Transformation von Agrobakterien

20

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Vervliet et al. Gen. Virol (1975) 26, 33). Der in Beispiel 6 beschriebene Pflanzenexpressionsvektor #945 HPV16-L1 h wurde zur Transformation des *Agrobacterium* Stammes C58C1 (Debleare et al. 1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) verwendet.

30

2. Tabaktransformation

10 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Tabaksterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium mit 2% Saccharose inkubiert, welches 50µl einer unter Selektion (Kanamycin, Ampicilin; Rifampicin) gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* enthielt. Nach 5-minütigem, leichten Schütteln wurden die Petrischalen bei 24°C im Dunkeln aufbewahrt. Nach 2 Tagen wurden die Blätter zur Induktion des

35

Kallus auf MS-Medium mit 1,6% Glucose, 5mg/l Naphtylelessigsäure, 0,1 g/l Benzylaminopyrin, 250mg/l Ticarcilin, 50mg/l Kanamycin und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter auf MS-Medium überführt, welches 1,6% Glucose, 2mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphtylelessigsäure, 0.02mg/l Gibberellinsäure, 250mg/l Ticarcilin, 50mg/l Kanamycin und 0.8% Bacto-Agar enthielt und der Induktion von Sprossen dient. Nach einer weiteren Woche erfolgte die Kultivierung unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989), EMBO J. 8:23-29). Es konnten 88 transgene Pflanzen regeneriert werden.

3. Nachweis der Akkumulation von HPV16-L1 h in Pflanzenextrakten im Western Blot

Der Nachweis, dass die transgenen Tabakpflanzen das virale Hüllprotein HPV16-L1 h exprimieren, erfolgte im Western Blot. Dazu wurden Blattscheiben (ca. 50mg) in 2-fach konzentriertem "Ladepuffer" (50mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS, 10% Glyzerin, 5% β -Mercaptoethanol, 0.2% Bromphenolblau; Lämmli U.K. (1970), Nature 227: 680-685) extrahiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen. Gleiche Mengen des Proteinextraktes (ca. 20 μ g) wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und in einem 12.5% SDS-Polyacrylamidgel separiert. Als Kontrolle wurden 40/80 μ g aus Insektenzellen gereinigtes HPV16-L1 h auf das Gel geladen. Anschliessend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) mit Hilfe eines semi-Dry-Blotters transferiert. Zum immunologischen Nachweis des HPV16-L1 h wurde ein polyklonaler HPV16-L1 -Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Handhabung des sekundären Antikörpers (Pierce, Rockford) erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Durch den Antikörper markiertes Antigen wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) sichtbar gemacht. Die Größenabschätzung erfolgte anhand von Markerproteinen mit bekannter Molekülmasse. Es zeigte sich, dass in transgenen Tabakpflanzen große Mengen von HPV16-L1 h exprimiert werden (Fig. 14).

Tabelle 1

	HPV 16 L2 human % der L2 Kodons	HPV16 L2 original % der L2 Kodons	HPV 16 L1 human % der L1 Kodons	HPV 16 L1 plant % der L1 Kodons	HPV 16 L1 original % der L1 Kodons
Ala					
		GCA	0,0	0,0	2,8
		GCG	0,0	0,0	0,0
		GCC	6,1	5,9	1,2
		GCT	0,0	0,0	2,0
Arg		AGA	0,0	0,0	0,8
		AGG	4,4	3,8	0,8
		CGA	0,0	0,0	0,8
		CGG	0,0	0,0	0,2
		CGC	0,0	0,0	0,8
		CGT	0,0	0,0	0,4
Asn		AAC	3,8	5,5	1,4
		AAT	0,0	0,0	4,2
Asp		GAC	6,3	5,3	1,8
		GAT	0,0	0,0	3,6
Cys		TGC	0,4	2,4	0,6
		TGT	0,0	0,0	1,8
Gln		CAA	0,0	0,0	2,2
		CAG	2,3	3,8	1,6
Glu		GAA	0,0	0,0	2,8
		GAG	2,1	4,0	1,2
Gly		GGA	0,0	0,0	1,6
		GGG	0,0	0,0	0,6
		GGC	6,8	6,9	1,8
		GGT	0,2	0,0	3,0
His		CAC	1,7	2,0	0,4
		CAT	0,0	0,0	1,6
Ile		ATA	0,0	0,0	2,0
		ATC	8,5	4,4	0,0
		ATT	0,0	0,0	2,4
Leu		CTA	0,0	0,0	1,4
		CTG	5,9	8,5	1,0

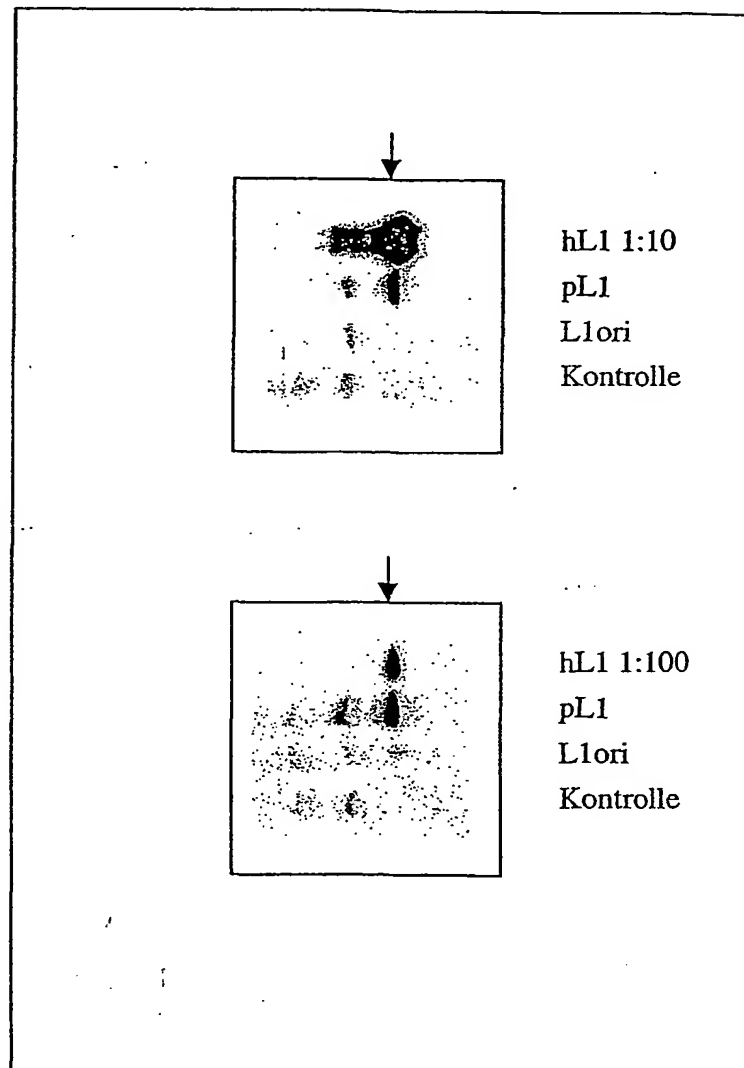
Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die für ein HPV16-L1 mit der in Fig. 5 oder 6 gezeigten DNA-Sequenz oder für HPV16-L2 mit der in Fig. 7 gezeigten DNA-Sequenz kodiert.
2. DNA-Sequenz, die für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines HPV16-L1 oder eines HPV16-L2 kodiert und die ein Fragment oder eine Variante der in Fig. 5, 6 oder 7 gezeigten DNA-Sequenz ist.
3. DNA-Sequenz nach Anspruch 2, die für ein HPV16-L1 kodiert und die in Fig. 13 gezeigte DNA-Sequenz aufweist.
4. DNA-Sequenz, die für ein Fusionsprotein aus einem HPV16-L1 und einem HPV16-E7 kodiert und die in Fig. 8, 9 oder 10 gezeigte DNA-Sequenz aufweist.
5. Expressionsvektor, enthaltend die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1-4.
6. Expressionsvektor nach Anspruch 5, wobei die DNA-Sequenz mit einem pCMV-Promotor funktionelle verknüpft ist.
7. Expressionsvektor nach Anspruch 5, nämlich pL1 (DSM 13745), hL1 (DSM 13746) bzw. hL2 (DSM 13747).
8. Wirtszelle, transfiziert mit einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1-4 oder einem Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 5-7.
9. Wirtszelle nach Anspruch 8, wobei die Wirtszelle eine tierische Zelle ist.

10. Wirtszelle nach Anspruch 8, wobei die Wirtszelle eine pflanzliche Zelle ist.
- 5 11. Vakzinierungsmittel, enthaltend den Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 5-7 oder ein durch diesen kodiertes Protein.
- 10 12. Verfahren zur Herstellung eines HPV16-L1 oder eines HPV16-L2, das die Züchtung der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 8-10 unter geeigneten Bedingungen und die Gewinnung des Proteins aus der Zelle oder dem Zuchtmedium umfaßt.

Fig.1

HPV16-L1-Expression durch Modifikation des Leserrahmens



2 / 18

Fig. 2A

Direkte und indirekte Effekte der modifizierten Leserahmen

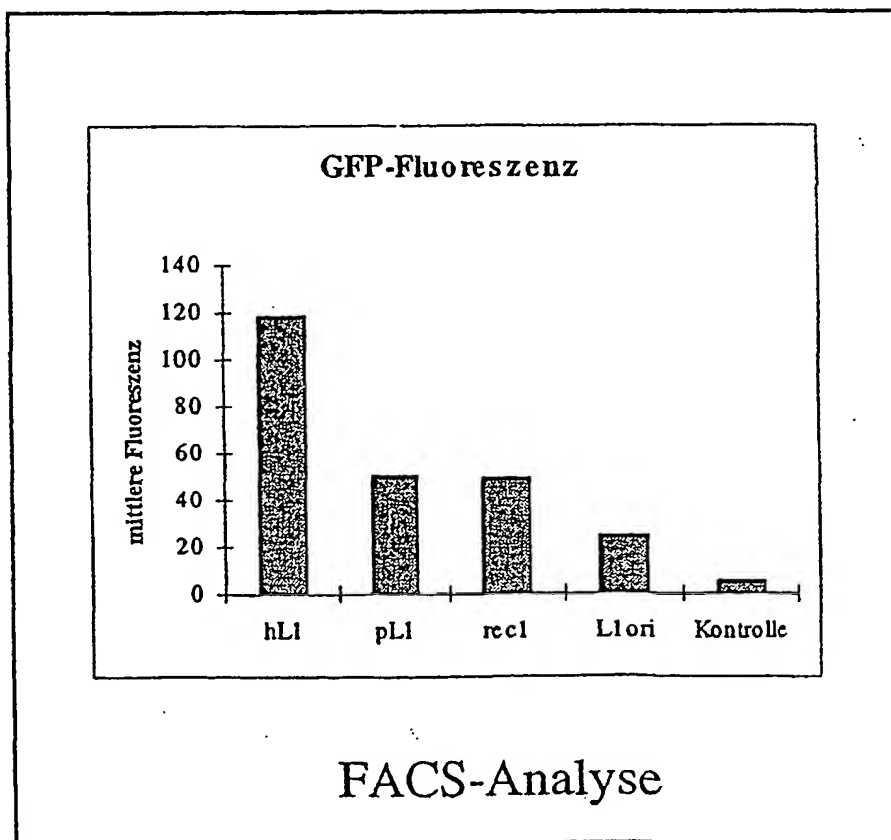
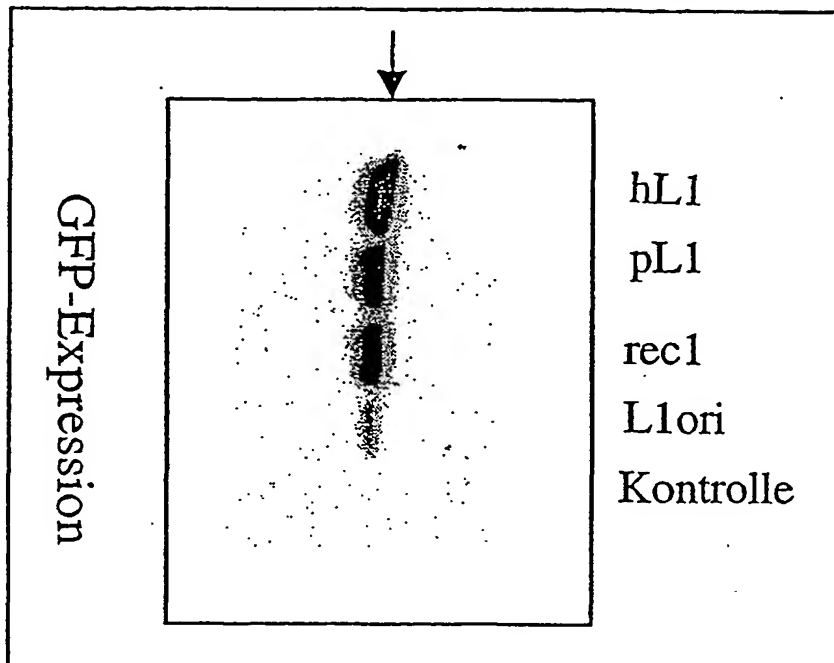


Fig. 2B

Direkte und indirekte Effekte der modifizierten Leserahmen

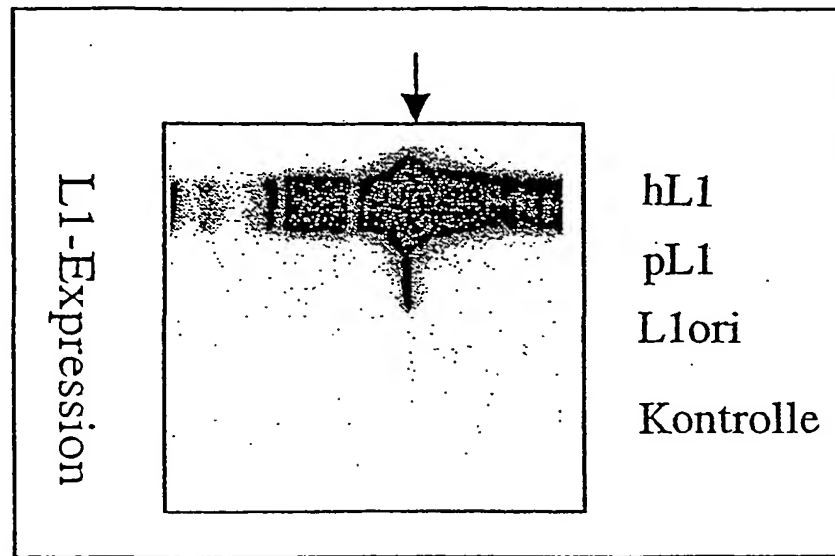


Fig. 2C

Direkte und indirekte Effekte der modifizierten Leserahmen

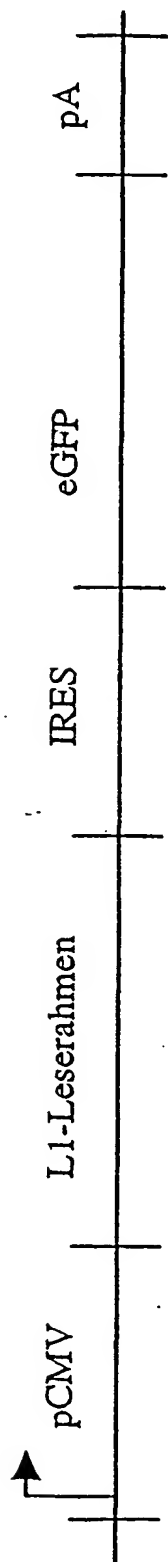


Fig. 3

HPV16-L2-Expression durch Modifikation des Leserahmens

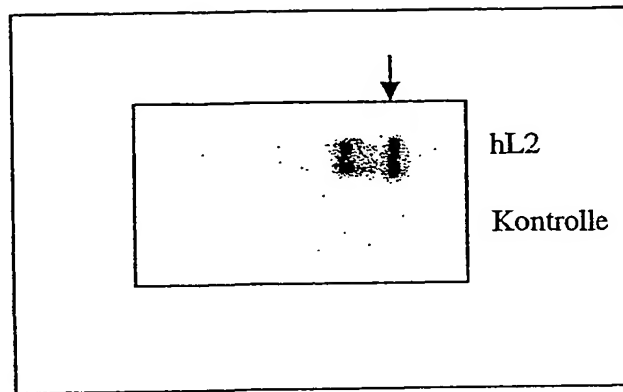
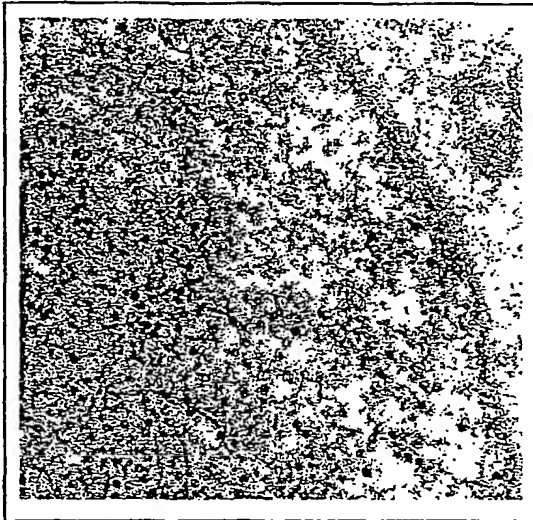


Fig. 4

Partikelbildung nach Expression von HPV16-L1 in 911-Zellen

A



B

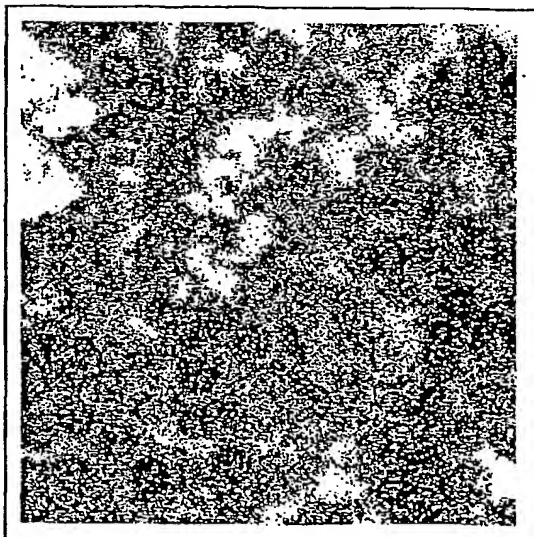


Fig. 5 HPV 16 L1 plant

1 ATGTCACITTT GGTTCCTCATC AGAAGCTACT GTTTCACCTTC CACGAGTTC AGTTTCAAAA GTTCTTTTCA CTTGCTTAGG ACTAATATTT ACTACCATGC TGGAACTTCA
M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E Y V A R T N I Y Y H A G T S

121 AGGCTCTCTG CTGTTGGACA TCCATACITTT CCAATTAAAA AACCAATAAA TAATAAAATT CTTCTTCCAA AGTTTCAGG ACTTCAATAC AGGCTTTTTC GGATTCATCT TCCAGATCCA
R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P

241 AATAAATTG GATTTCAGGA TACTTCATTT TACAATCCAG ATACTCAAG GCTTCTTTGG CTTCTCTTGG GACTTGAAGT TGGAGGGGA CAACCACTTG GACTTGGAAAT TTCAGGACAT
N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H

361 CCACCTCTTA ATAACTTGA TGATCTGAA AATGCTTCAG CTACGCTGC TAATGCTGGA GTTCATATA GCGAATGTAT TTCATGGAT TACAAACAAA CTCAACTTTG TCTTATTTGA
P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G

481 TGTAAACCAC CAATTGGAGA ACATTGGGA AAGGATCAC CATGTACTAA TGTCTCTGTT AATCCAGAG ATTCTCCACC ACTTGAACIT ATTAATCTG TTATTTCAAGA TCGAGATATG
C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M

601 GTTCATCTG GATTGGAGC TATGATTTT ACTACTCTTC AAGCTAATAA ATCAGAAGT CCACCTGATA TCTGTACTTC AATTGTAAA TACCAGAGAT ACATTAATAAT GGTTCAGAA
V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E

721 CCATACGAG ATTCACTTTT TTTTACCTT AGGAGGGAC AAATGTTGT TAGGCATCTT TTAATAGGG CTGGAGCTGT TGCAGAAAAT GTTCCAGATG ATCTTTACAT TAAAGCATCA
P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S

841 GCACTCACTG CTAATCTTGC TTCAATCAAT TACTTTCCAA CTCCATCAGG ATCAATGTT ACTTCAGATG CTCAAATTTT TAATAAAACCA TACTGGCTTC AAAGGCTCA AGGACATAAT
G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N

961 AATGGAAATT GTTGGGAAA TCAACTTTT GTTACTGTG TTGATCTAC TAGTCAACT TAGTCAACT AATATGTCAC TTTGTGCTGC TATTTCAACT TCAGAAACTA CTTACAAAAA TACTAATTTT
N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F

1081 AAAGAATACC TTAGCATGG AGAAGAATAC GATCTTCAAT TTATTTTCA ACTTTGTAAA ATTACTTTA CTGCTGATGT TATGACTTAC ATTCAATCAA TGAATTCAC TATTTGTGAA
K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E

1201 GATTGGAAAT TTGCACTTCA ACCACCAACA GGAGGAAGTC TTGAAGATAC TTACAGGTTT GTTACTTCAC AAGCTATTGC TTGTCAAAAA CATACTCCAC CAGCTCCAAA AGAGATCCA
D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F Y T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P

1321 CTTAAAAAAT ACACCTTTTG GGAAGTTAAT CTTAAAGAAA AATTTTCAGC AGATCTTCAT CAATTTCCAC TTGGAAGGAA ATTCTTCTT CAAGCTGGAC TTAAAGCTAA ACCAAAAATT
L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q A G L K A K P K F

1441 ACTCTTGGAA AAGGAAAGC TACTCCAACT ACTTCATCAA GTTCAACTAC TGCTAAAGG AAAAAAGGA AACTTTGA
T L G K R K A T P T T S S T S T A K R K K R K L -

7/18

Fig. 6 HPV 16 L1 human

1 ATGAGCCTGT GGCTGCCAG CGAGGCCACC GTGTACCTGC CCCCCTGTC CGTGACCAAG GTGTGACCA CGACGAGTA CGTGCCAGG ACCAACATCT ACTACCAGCG CGGCACCAGC
 M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E Y V A R T N I Y X H A G T S
 121 AGGTGCTGG CGGTGGGCA CCCCCTACTTCC CCAATCAAGA AGCCCAACAA CAACAAGATC CTGTGCCCCA AGGTGACCG CCTGCAGTAC AGGTGTTCA GGTATCCACT CCCCACCCCC
 R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P
 241 AACAAATTCG GCTTCCCGA CACCAAGTTC TACAAACCGG AACCCACAG GCTGTGTGG GCTGTGCTGG GCGTGCAGGT GGCAGGGGG CAGCCCCCTGG GGTGGGCAAT CAGCGGCCAC
 N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H
 361 CCGCTGCTGA ACAAGCTGA CGACACCGAG AACGCCAGG CCTACGCCG CAACGCCGG GTGACAAACA GGGAGTGCAT CAGCATGAC TACAAGCAGA CCCAGCTGTG CCTGATCGGC
 P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G
 481 TGCAAGCCCC CCATCGCGA GCACTGGGGC AAGGGGACCC CCTGCACCAA CGTGGCCGTG AACCCCGCG ACTGCCCCCC CCTGGAGCTG ATCAACACCG TGATCCAGGA CGGCGACATG
 C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M
 601 GTGACACCG CTTCCGGCG CATGCACTTC ACCACCTGC AGGCCAACAA GAGCGAGTG CCCTGACCA TCTGCACCA CATCTGCAAG TACCCGCACT ACATCAAGAT GGTGAGCGAG
 V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E
 721 CCCTAGCGCG ACAGCCTGT CTCTACCTG AGGAGGAGC AGATTTCTT GAGGCACCTG TTCACAGGG CGGCGCGCTT GGGCGAGAC GTGCCGACG ACCTGTACAT CAAGGCGACG
 P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S
 841 GGCACACCG CCAACCTGG CAGCAGCAAC TACTTCCCA CCCCAGCG CAGCATGCTG ACCAGGAGC CCAGATCTT CAACAGCCC TACTGGCTGC AGAGGGCCCA GGGCCACAC
 G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N
 961 AACGCACTC GTGGGGCAA CCAGCTGTTT GTGACCGTGG TGGACACCA CAGGAGCACC AACATGAGC TGTGGCGCG CATCAGCACC AGCGAGACCA CCTACAGAA CACCAACTTC
 N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F
 1081 AAGCAGTACC TGAGGCACCG CGAGGAGTAC GACCTGCACT TCATCTTCCA GCTGTCCARG ATCACCTGA CCGCCGACGT GATGACCTAC ATCCACAGCA TGAACAGCAC CATCCTGGAG
 K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E
 1201 GACTGGAACT TGGGCTGCA GCGCCGCCCC GCGGCGACCC TGAAGGACAC CTACAGTTC GTGACGACC AGGCCATCGC CTGCCAGAG CACACCCCCC CCGCCCCCAA GGAGGACCCC
 D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P
 1321 CTGAGAAAGT ACACCTCTG GGAGTGAAC CTGAAGGAGA AGTTACGCG CCACTGAGC CAGTTCCGCC TGGGAGGAA GTTCTGCTG CAGCGCGGCC TGAAGGCCAA GCGCAAGTTC
 L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q A G L K A K P K F
 1441 ACCCTGGGCA AGAGGAGGC CACGCCACC ACCAGCAGCA CCAGCACCAC CGCCAGAGG AACAGAGGA ACCTCTGA
 T L G K R K A T P T T S S T S T A K R K K L -

Fig. 7 HPV 16 L2 human

1 ATGAGGCACA AGAGGAGCGC CAAGAGGACC AAGAGGGCCA GGGCCACCCA GGTGTACAG ACCTGCAAGC AGCCCGGCAC CTGCCCCCCC GACATCATCC CCAAGGTGGA GGGCAAGACC
 M R H K R S A K R T K R A S A T Q L Y K T C K Q A G T C P P D I I P K V E G K T
 121 ATGCGCGACC AGATCCTGCA GTACGGCAGC ATGGGGGTGT TCTTCGGGG CCGTGGGATC GGCACCGGCA GGGGCACGG CGGCAGGACC GGCTACATCC CCCTGGGCAC CAGGCCCCCCC
 I A D Q I L Q Y G S M G V F F G G L G I G T G S G T G G R T G Y I P L G T R P P
 241 ACGGCCACCG ACACCCCTGGC CCCCCTGAGG CCCCCTGTA CCGTGGACCC CCGTGGGCC CCGTGGTGA GATCGTGA GAGACCAGCT TCATCGACGC CGCGGCCCCC
 T A T D T L A P V R P P L T V D P V G P S I V S L V E E T S F I D A G A P
 361 ACCAGCGTGC CCAGCATCCC CCGCGACGTG AGCGGCTTCA GCATCACAC CAGCACCGAC ACCACCCCGG CCATCCTTGA CATCAACAAAC ACCGTGACCA CCGTGACCAC CCACAACAAAC
 T S V P S I P P D V S G F S I T T S T D T T P A I L D I N N T V T T V T T H N N
 481 CCCACCTTCA CCGACCCCGC CGTGTGTCAG CCCCCACCCC CCGCCGAGAC CGCGGGCCAC TTCACCTGTA GCAGCAGCAC CATCAGCACC CACAACCTAG AGGATATCCC CATGACACCC
 P T F T D P S V L Q P P T P A E T G G H F T L S S T I S T H N Y E E I P M D T
 601 TTATATGTA GCACCAACCC CAACACCGTG ACCAGAGCA CCCCCATCCC CCGCAGCAGG CCGTGGGCC GTACAGCAGG ACCACCCAGC AGGTGAAGGT GGTGACCCCC
 F I V S T N P N T V T S S T P I P G S R P V A R L G L Y S R T T Q Q V K V V D P
 721 GCCTTCGTA CCACCCCCAC CAAGTGATC ACCTAGACCA ACCCCGCTA CGAGGGCATC GACGTGACA ACACCTGTA CTCAGCAGC AACCAACAA GCATCAACAT CGCCCCCGAC
 A F V T T P T K L I T Y D N P A Y E G I D V D N T L Y F S S N D N S I N I A P D
 841 CCGGACTTCC TGGACATCGT GGCCCTGCAC AGGCCGCCC TGACCAGCAG GAGGACCGGC ATCAGGTACA GCAGGATCGG CAACAAGCAG ACCGTGAGGA CCAGGAGCGG CAAGAGCATC
 P D F L D I V A L H R P A L T S R R T G I R Y S R I G N K Q T L R T R S G K S I
 961 GCGGCCAAGG TGCATCTACTA CTACACCTG AGCACATCG ACCCCGCGCA GGAGATCGAG CTGCAGACCA TCACCCCGCAG CACCTAGACC ACCACAGCC ACGCCGCCAG CCCCACGAGC
 G A K V H Y X Y D L S T I D P A E E I E L Q T I T P S T Y T T T S H A A S P T S
 1081 ATCAACAACG GCGGTATGCA CATCTACGCC GACGACTTCA TCACCGACAC CAGCACACC CCGGTGCCCA GCGTGGCCAG CACGAGCCTG AGCGGTACA TCCCGGCCAA CACCACCATC
 I N N G L Y D I Y A D D F I T D T S T T P V P S V P S T S L S G Y I P A N T T I
 1201 CCCTTCGGTG GCGCTACAA CATGCCCTG GTAGCGGGC CCGACATCCC CATCAATC ACCGACGAG CCCCAGCCT GATCCCATC GTGCCCCGCA GCGCCAGTA CACCATCATC
 P F G G A Y N I P L V S G P D I P I N I T D Q A P S L I P I V P G S P Q Y T I I
 1321 GCGGACGGG GCGACTTCTA CCTGCACCCC AGCTACTACA TGCTAGGAA GAGGAGGAG AGGCTGCCCT ACTTCTTCAG CGACGTGAGC CTGCGCCGCT GA
 A D A G D F Y L H P S Y Y M L R K R R K R L P Y F F S D V S L A A -

Fig. 8 16 L1 human delta C E7 1-60

1 ATGAGCCTGT GGTGCGCCAG CGAGGCCACC GTGTACTGCG CCCCCGTGCC CGTGAGCAAG GTGTGAGCA CCGACGAGTA CTTGGCCAGG ACCAATCTCT ACTACCACGC CGGCACCAGC
 M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E Y V A R T N I Y X H A G T S
 121 AGGCTGTGG CGGTGGGCCA CCGCTACTTC CCGATCAAGA AGCCCAACAA CAACAAGATC CTGTGCGCCA AGGTAGGGG CTTGCAGTAC AGGTGTTC A GATCCACCT GCGCGACCCC
 R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P
 241 AACAAAGTGG GCTTCCCGCA CACCAAGCTTC TACAACCCCG ACACCCAGAG GCTGTGTGG GCTGTGCTGG GCGTGGAGGT GGCAGGGGG CAGCCCCCTGG GGTGGGCAT CAGCGGCCAC
 N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H
 361 CCGCTGTGA ACAAGCTGGA CGACACCGAG AAGGCCAGCG CCTAGCGCGC CAAGCGCGC GTGACAACA GGAGTGCAT CAGCATGCAC TACAAGCAGA CCGAGCTGTG CCGTATCGGC
 P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G
 481 TCGAAGCCCC CCATCGGCGA GCACCTGGGG AAGGGCAGCC CCTGCACCAA CGTGGCCGTG AACCCCGCGC ACTGCCCGCC COTGGAGCTG ATCAACACCG TGTCCAGGA CCGCGACATG
 C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M
 601 GTGGACACCG GCTTGGGCGC CATGCACTTC ACCACCTGCG AGGCCAACAA GAGCGAGGTG CCCTGGACA TGTGCACCG CATCTGCAG TACCCCGACT ACATCAAGAT GGTGAGCGAG
 V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E
 721 CCCTAGCGCG ACAGCTGTG CTTCTACCTG AGGAGGAGC AGATGTCGT GTGCACAGG CCGGCGCGGT GGGCGAGNAC GTGCCCGACG ACCTGTACTT CAAGGGGAGC 10/18
 P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S
 841 GGCAGCACCG CCAACTGCG CAGCAGCAAC TACTTCCCCA CCCCCAGCG CAGCATGGTG ACCAGCGAG CCGCATCTTT CAACAACCC TACTGGCTGC AGAGGGCCCA GGGCCACAA
 G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N
 961 AAGGCACTCT GCTGGGGCAA CCAGCTGTTT GTGACCGTGG TGGACACCA CAGCAGCACC AACATGAGCC TGTGCCCGC CATCAGCACC AGCGAGACCA CTTACAAGAA CACCAACTTC
 N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F
 1081 AAGGATACC TCAGGCACCG CGAGGAGTAC GACCTGCACT TCATCTTCCA GCTGTGCAAG ATCACCCTGA CCGCCGACGT GATCAGCTAC ATCCACAGCA TGAACAGCAC CATCTGGAG
 K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E
 201 GACTGGAAT TCGGCTGCA GCGCCCGCCC GCGGGCACCC TGGAGGACAC CTACAGTTT GTACCCAGCC AGGCCATGCC CTGCCAGAG CACACCCCCC CCGCCCCCAA GGAGGACCCC
 D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P
 321 CTGAAGAAT ACACCTTCTG GGAGGTGAAC CTGAAGGAGA AGTTCAGCG CAGCTGCGC CAGTCCCGC TGGCAGGAA GTTCCCTGCTG CAGGCGGCA TGCATGGAGA TACACCTACA
 L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q A G M H G D T P T
 441 TTGCATGAAT ATATGTTAGA TTGCAACCA GACACAAGTG ATCTCTACTG TTATGACAA TTAATGACA GCTCAGACA GGAGCATGAA ATACATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACCG
 L H E Y M L D L Q P E T T D L Y C Y E Q L N D S S E E E I D G P A G Q A E P
 561 GACAGAGCCC ATTACAATAT TGTAACTTT TGTGCAAGT AA
 D R A H Y N I V T F C C K -

Fig. 9 16L1 human delta C NLS-E7 (short)

1 ATGAGCCTGT GGCTGCCCCAG CAGGCGCACC GTGTACCTGC CCGCGTGC CGTGAGCAAG GTGCTACCA CCGACAGTA CGTGCGCAGG ACCAACATCT ACTACACGC CGGACACCAG
 M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E Y V A R T N I Y Y H A G T S
 121 AGGCTGCTGG CCGTGGGCCA CCGCTACTTC CCGATCAAGA AGCCCAACAA CAACAAGATC CTGCTGCCA AGGTGACGG CCGTCACTAC AGGTCTTCA GGATCCACCT GCCCGACCCC
 R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P
 241 AACAACTTCG GCTTCCCCGA CACCACTTTC TACRACCCCG ACACCCAGAG GCTGGTGTGG GCTGGCTGG GCGTGAAGT GGGCAGGGC CAGCCCTGG CCGTGGCAT CAGCGGCCAC
 N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H
 361 CCGCTGCTGA ACAAGCTGGA CGACACCGAG AACGCCAGCG CTTACGCCCG CAACGCCGCG GTGACACACA GGAAGTGCAT CAGCATGGAC TACAAGCAGA CCGAGCTGTG CCGTATCGGC
 P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G
 481 TCGAACCCCC CCATCGGCCA GCATGGGGC AAGGCGAGCC CCGTGCACCA CGTGGCGGTG AACCCGCGC ACTGCCCGCC CCGTGAAGT ATCAACACCG TGATCCAGGA CGGCGACATG
 C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M
 601 GTGACACCG GCTTGGGGC CATGACTTC ACCACCTTC AGGCCAACAA GACGAGGTG CCGCTGACA TCTGACACAG CATCTCCAAG TACCCGACT ACATCAAGAT GGTGACGAG
 V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E
 721 CCTACGGCG ACAGCTGTT CTCTACCTG AGGAGGAGC AGATGTTCT GAGGCACCTG TTCAACAGGG CCGCGCGCGT GGGCGAGAAC GTGCGCGAGC ACCTGTACAT CAAGGCGAGC
 P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S
 841 GGCAGACCG CCAAGCTGGC CAGCAGAAC TACTCCCCA CCGCAGCGG CAGCATGCTG ACCAGCAGC CCGAGATCTT CAACAGGCC TACTGCTGC AGAGGCCCA GGGCCACAAC
 G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N
 961 AACGGCATCT GCTGGGGCAA CAGCTGTTT GTGACCGTGG TGCACACAC CAGGAGCACC AACATGAGCC TGTGCGCGC CATCAGCACC AGCGAGACCA CCTACAGAA CACCAACTTC
 N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F
 1081 AAGAGTACC TGAGGCACCG CGAGGAGTAC GACCTGCACT TCACTCTTCA GCTGTGCAAG ATCACCCTGA CCGCGCACGT GATGACCTAC ATCCACAGCA TGAACAGCAC CATCTGGAG
 K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E
 1201 GACTGGAACT TCGGCTGCA GCGCGCCCCC GCGGCGACCC TGCAGGACAC CTACAGTTTC GTACACAGCC AGGCCATCGC CTGCGAGAG CAGACCCGCC CCGCGGCCAA GGAGGACCCC
 D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P
 1321 CTGAAGAACT ACACCTTCTG GAGGTGAAC CTGAAGGACA AGTTACGGC CAGTTCGCC CAGTTCGCC TGGCGAGGAA GTTCTGCTG CAGCGCGCA TGCATCCCA GAAGAAAGG
 L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q A G M H P K K K R
 1441 AAGTGGAAAT ATATGTTACA TTGCAACCA GACACAACTG ATCTCTACTG TTATGAGGAA TTAATGACA GCTCAGAGCA GGAGATGAA ATAGTGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACG
 K V E Y M L D L Q P E T T D L Y C Y E Q L N D S S E E E D E I D G P A G Q A E P
 1561 GACAGAGGCC ATTAACAAT TGTACCTTT TGTGCAACT AA
 D R A H Y N I V T F C C K -

11/18

Fig. 10 16 L1 human delta C NLS E7 (long)

1 ATAGAGCGGT GGCTGCCAG CGAGGCCACC GTGTACCTGC CCCCCTGCC CGTCAGCAAG GTGGTGAGCA CGACAGATTA CGTGCCGAGG ACCAACATCT ACTACCACCG CGGCACGAG
M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E Y V A R T N I Y Y H A G T S
121 AGGCTGCTGG CCGTGGGCGA CCGCTACTTC CCGATCAAGA AGCCCAACAA CAACAGATC CTGGTGCCCA AGGTGACGG CCTGAGTAC AGGTGTTC GATCCACCT GCCGACCCCC
R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P
241 AACAGTTCG GCTTCCCCGA CACCACTTC TACAACCGG ACACCCAGAG GCTGTGTGG GCCTCGTGG CGGTGAGGT GGGCAGGGC CAGCCCTGG CGGTGGCAT CAGCGGCCAC
N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H
361 CCGCTGCTGA ACAAGCTGA CCACACCGAG AACCCACGG CTTACCGCG CTAACCGCG GTGACAAACA GGAATGCAT CAGATGGAC TACAAGCAGA CCCAGCTGG CCGATCGGG
P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G
481 TCGAACCCCC CCACTGGGCGA GCACTGGGCGA AAGGCGAGCC CCGTGCACCA CCGTGGCGGT AACCCCGCG ACTGCCCGG CCTGAGCTG ATCAACACCG TGATCCAGCA CGCGGACATG
C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M
601 GTGGACACCG GCTTCGGGCG CATTGACTTC ACCACCTGCG AGGCCAACAA GAGCGAGTG CCCCTGGACA TCTGCACCA CATTGTGCAAG TACCCGACT ACATCAAGAT GGTGACCGAG
V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E
721 CCCTACGGCG ACAGCGGT CTTCTACCTG AGAGGGAGC AGATGTTCTT GAGGCACTG TTAACACGG CCGGCGCGCT GGCGGAGAC GTGCCGAGC ACCTGTACAT CAAGGCGAGC
P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S
841 GGCACACCG CCAACCTGGC CAGCAGCAC TACTTCCCCA CCCCACGG CAGCATGCTG ACNAGCGAG CCCAGATCTT CAACAGCCC TACTGGCTGC AGAGGGGCCA GGGCCACAAC
G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N
961 AACGGCATCT GCTGGGCGAA CCACTGTTC GTACCGTGG TGGACACCA CAGGACCA CAGATGAGC TGTGGCGCG CATTGAGCC AGCGAGACC CATTACAGAA CACCAACTTC
N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F
1081 AAGAGTACC TGAGCACCG CGAGGATPAC GACCTGCAGT TCATCTTCCA GCTGTGCAAG ATCACCTGA CCGCGGAGT GATGACCTAC ATCCACAGCA TCAACAGCAC CATCTGGAG
K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E
1201 GACTGAACT TCGGCTGCA GCGCCCGCCC GCGGCGACCC TGAGGACAC CTACAGTTC GTACCAAGC AGGCATGCG CTGCCAGAG CACACCCCGC CCGCCCGCAA GAGGACCGC
D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P
1321 CTGAAGAGT ACACCTTCTG GGAGGTGAAC CTGAAGGACA AGTTACCGC CGACCTGGAC CAGTTCCCC TGGGACGAA GTTCTGCTG CAGGCGCGCA TGCATCCCA GAAGAAAGG
L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q A G M H P K K K R
1441 AAGGTGATC ACGAGATAC ACCTACATG CATGATATA TGTAGATTT GCAACAGAG ACACTGATC TCTACTTTA TGACCAATTA ATGACAGCT CAGAGGAGGA GATGAATA
K V M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T D L Y C Y E Q L N D S S E E D E I
1561 CATGTGCCAG CTGACACAGC AGAACCGGAC AGACCCCAT ACAATATTGT AACCTTTGT TGCAGTAA
D G P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K -

12/18

Fig. 11

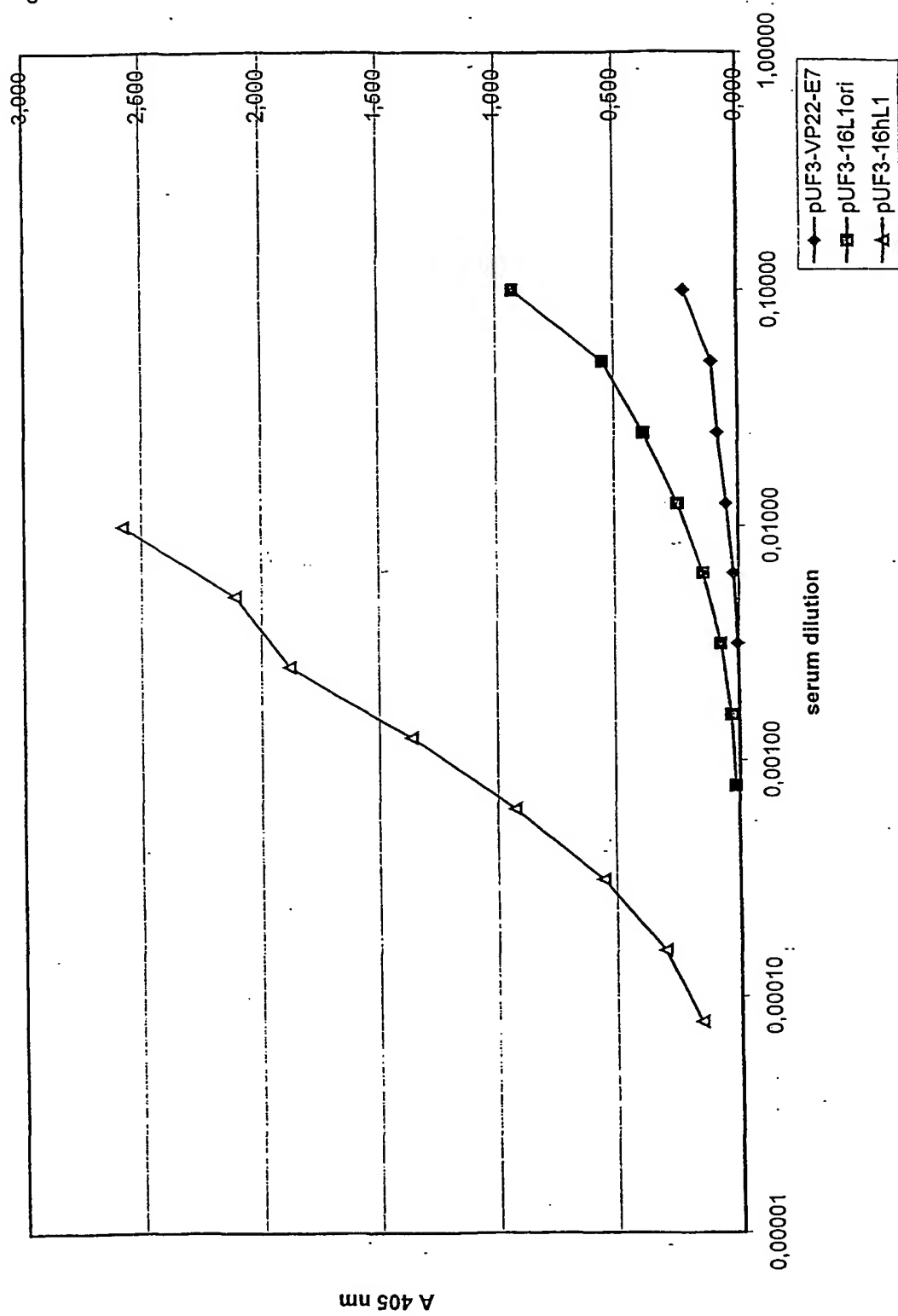
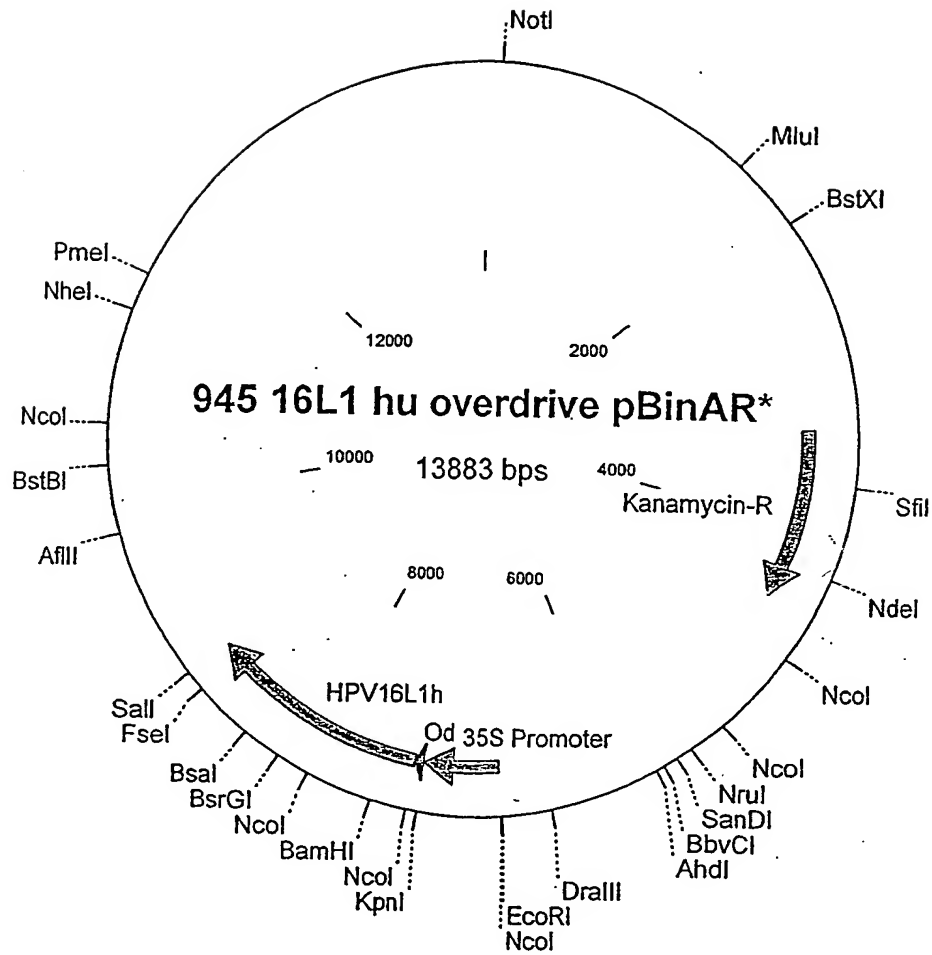


Fig. 12



15 / 18

Fig. 13

1 CGTTGTAAAA CGACGGCCAG ^{EcoRI} TGAATTCCTCA ^{NcoI} TGGAGTCAAA GATTCAAATA GAGGACCTAA
 » » 35S Promoter »

61 CAGAACTCGC CGTAAAGACT GGCGAACAGT TCATACAGAG TCTCTTACGA CTCAATGACA
 » 35S Promoter »

121 AGAAGAAAAT CTTCTGTCAC ATGGTGGAGC ACGACACGCT TGTCTACTCC AAAAATATCA
 » 35S Promoter »

181 AAGATACAGT CTCAGAAGAC CAAAGGGCAA TTGAGACTTT TCAACAAAGG GTAATATCCG
 » 35S Promoter »

241 GAAACCTCCT CGGATTCCAT TGCCCAGCTA TCTGTCACTT TATTGTGAAG ATAGTGGAAA
 » 35S Promoter »

301 AGGAAGGTGG CTCCTACAAA TGCCATCATT GCGATAAAGG AAAGGCCATC GTTGAAGATG
 » 35S Promoter »

361 CCTCTGCCGA CAGTGGTCCC AAAGATGGAC CCCACCCAC GAGGAGCATC GTGGAAAAAG
 » 35S Promoter »

421 AAGACGTTCC AACCACGTCT TCAAAGCAAG TGGATTGATG TGATATCTCC ACTGACGTAA
 » 35S Promoter »

481 GGGATGACGC ACAATCCCAC TATCCTTCGC AAGACCCTTC CTCTATATAA GGAAGTTCAT
 » 35S Promoter »

541 TTCATTTGGA GAGGACAGGG ^{KpnI} TACCTTTACA ACAATTACCA ACAACAACAA ACAACAAACA
 » 35S Promoter »
 » » Od »

601 ACATTACAAT TACTATTTAC AATTACCATG GCCCTGTGGC TGCCCAGCGA GGCCACCGTG
 » Od »
 » » HPV16L1h »

661 TACCTGCCCC CCGTGCCCGT GAGCAAGGTG GTGAGCACCG ACGAGTACGT GGCCAGGACC
 » HPV16L1h »

721 AACATCTACT ACCACGCCGG CACCAGCAGG CTGCTGGCCG TGGGCCACCC CTACTTCCCC
 » HPV16L1h »

781 ATCAAGAAGC CCAACAACAA CAAGATCCTG TGCCCCAAGG TGAGCGGCCT GCAGTACAGG
 » HPV16L1h »

841 GTGTTTCAGGA TCCACCTGCC CGACCCCAAC AAGTTCGGCT TCCCCGACAC CAGCTTCTAC
 » HPV16L1h »

901 AACCCCGACA CCCAGAGGCT GGTGTGGGCC TGCGTGGGCG TGGAGGTGGG CAGGGGCCAG
 » HPV16L1h »

16 / 18

Fig. 13 (Forts. 1)

961 CCCCTGGGCG TGGGCATCAG CGGCCACCCC CTGCTGAACA AGCTGGACGA CACCGAGAAC
 ».....HPV16L1h.....»

1021 GCCAGCGCCT ACGCCGCCAA CGCCGGCGTG GACAACAGGG AGTGCATCAG CATGGACTAC
 ».....HPV16L1h.....»

1081 AAGCAGACCC AGCTGTGCCT GATCGGCTGC AAGCCCCCA TCGGCGAGCA CTGGGGCAAG
 ».....HPV16L1h.....»

1141 GGCAGCCCCT GCACCAACGT GGCCGTGAAC CCCGGCGACT GCCCCCCCCT GGAGCTGATC
 ».....HPV16L1h.....»

1201 AACACCGTGA TCCAGGACGG CGACATGGTG GACACCGGCT TCGGCGCCAT GGACTTCACC
 ».....HPV16L1h.....»
 NcoI

1261 ACCCTGCAGG CCAACAAGAG CGAGGTGCCC CTGGACATCT GCACCAGCAT CTGCAAGTAC
 ».....HPV16L1h.....»

1321 CCCGACTACA TCAAGATGGT GAGCGAGCCC TACGGCGACA GCCTGTTCTT CTACCTGAGG
 ».....HPV16L1h.....»

1381 AGGGAGCAGA TGTTCTGTAG GCACCTGTTT AACAGGGCCG GCGCCGTGGG CGAGAACGTG
 ».....HPV16L1h.....»

1441 CCCGACGACC TGTACATCAA GGGCAGCGGC AGCACCGCCA ACCTGGCCAG CAGCAACTAC
 ».....HPV16L1h.....»
 BsrGI

1501 TTCCCCACCC CCAGCGGCAG CATGGTGACC AGCGACGCCC AGATCTTCAA CAAGCCCTAC
 ».....HPV16L1h.....»

1561 TGGCTGCAGA GGGCCCAGGG CCACAACAAC GGCATCTGCT GGGGCAACCA GCTGTTCTGT
 ».....HPV16L1h.....»

1621 ACCGTGGTGG ACACCACCAG GAGCACCAC ATGAGCCTGT GCGCCGCCAT CAGCACCAGC
 ».....HPV16L1h.....»

1681 GAGACCACCT ACAAGAACAC CAACTTCAAG GAGTACCTGA GGCACGGCGA GGAGTACGAC
 ».....HPV16L1h.....»
 BsaI

1741 CTGCAGTTCA TCTTCCAGCT GTGCAAGATC ACCCTGACCG CCGACGTGAT GACCTACATC
 ».....HPV16L1h.....»

Fig. 13 (Forts. 2)

1801 CACAGCATGA ACAGCACCAT CCTGGAGGAC TGGAACTTCG GCCTGCAGCC CCCCCCGGC
 ».....HPV16L1h.....»

1861 GGCACCCTGG AGGACACCTA CAGGTTCTGT ACCAGCCAGG CCATCGCCTG CCAGAAGCAC
 ».....HPV16L1h.....»

1921 ACCCCCCCCG CCCCCAAGGA GGACCCCTG AAGAAGTACA CCTTCTGGGA GGTGAACCTG
 ».....HPV16L1h.....»

1981 AAGGAGAAGT TCAGCGCCGA CCTGGACCAG TTCCCCCTGG GCAGGAAGTT CCTGCTGCAG
 ».....HPV16L1h.....»
FseI

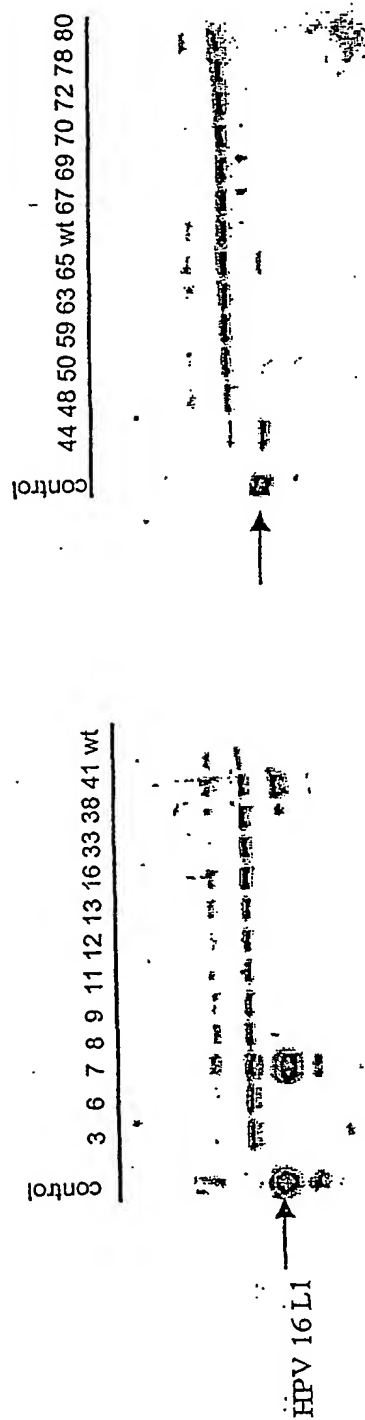
2041 GCCGGCCTGA AGGCCAAGCC CAAGTTCACC CTGGGCAAGA GGAAGGCCAC CCCACCACC
 ».....HPV16L1h.....»

2101 AGCAGCACCA GCACCACCGC CAAGAGGAAG AAGAGGAAGC TGTGAAAGCT TATCGATACC
 ».....HPV16L1h.....»»

SaII

2161 GTCGACCTGC AGGCATGCAA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA

Fig. 14



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/038769 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/37,
15/84, 15/85, 5/10, C07K 14/025, A61K 39/12, 48/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03618

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. September 2001 (19.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 55 545.4 9. November 2000 (09.11.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (DE). IPK, INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

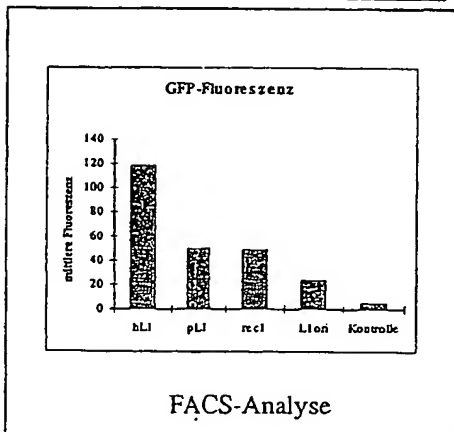
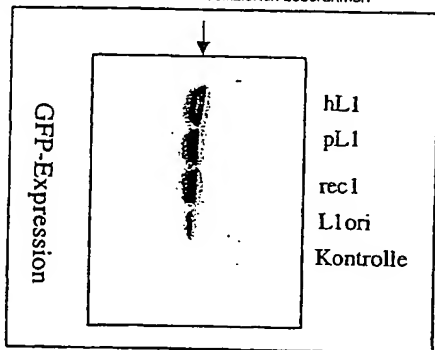
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Martin [DE/DE]; Siedlerweg 2, 69151 Neckargemünd (DE). LEDER, Christoph [DE/DE]; Woerthstrasse 12, 69115 Heidelberg (DE). KLEINSCHMIDT, Jürgen [DE/DE]; Weihwiesenweg 5, 69245 Bammental (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DNA SEQUENCES, WHICH CODE FOR OPTIMISED EUKARYOTIC HPV 16-L1 AND HPV 16-L2

(54) Bezeichnung: FÜR EXPRESSION IN EUKARYONTEN OPTIMIERTE HPV 16-L1 UND HPV 16-L2 KODIERENDE DNA-SEQUENZEN

Direkte und indirekte Effekte der modifizierten Leserastern



(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences that have been optimised with respect to the codon use, said sequences coding for an HPV 16-L1 capsid protein or an HPV 16-L2 capsid protein. Said DNA sequences comprise the DNA sequences or fragments or variants thereof that are illustrated in figures 5, 6 or 7 and permit the simple recombinant production of HPV 16-L1 or HPV 16-L2 capsid proteins or fragments thereof in high yields, without having to use viral vectors. The capsid proteins are preferably used for producing vaccines.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden hinsichtlich der Codon-Verwendung optimierte DNA-Sequenzen, die ein HPV 16-Kapsidprotein L1 bzw. HPV 16-Kapsidprotein L2 kodieren. Diese DNA-Sequenzen umfassen die in den Figuren 5, 6 oder 7 gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmente oder Varianten dieser DNA-Sequenzen und erlauben die einfache rekombinante Herstellung von HPV 16-L1- bzw. L2-Kapsidproteinen oder Fragmenten davon mit hoher Ausbeute unter Vermeidung der Verwendung viraler Vektoren, vorzugsweise zur Herstellung von Vakzinen.

WO 02/038769 A3



Quedlinburg (DE). **BIEMELT, Sophia** [DE/DE]; Pölle
38, 06484 Quelinburg (DE).

(74) **Anwalt: HUBER, Bernard**; Huber & Schüssler, Trud-
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

9. Januar 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. No.
PCT/DE 01/03618

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/37 C12N15/84 C12N15/85 C12N5/10 C07K14/025
A61K39/12 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 02694 A (ZHOU JIAN ;FRAZER IAN (AU); UNIV QUEENSLAND (AU)) 21 January 1999 (1999-01-21)	1-3
Y	page 15, line 23 -page 29, line 23; figures 2,3; examples 1-3,8; table 1	4-11
X	ZHOU JIAN ET AL: "Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 4972-4982, XP002164427 ISSN: 0022-538X	1-3
Y	the whole document	4-11
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2002

Date of mailing of the international search report

12/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/DE 01/03618

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CA 2 229 955 A (MEDIGENE AG) 20 August 1999 (1999-08-20)	2
Y	page 4, line 9 -page 6, line 7; example 1; table 1 & DATABASE GSN 'Online! 14 March 2000 (2000-03-14) retrieved from EBI Database accession no. AAZ48174 abstract & DATABASE GSP 'Online! 14 March 2000 (2000-03-14) retrieved from EBI Database accession no. AAY57720 abstract	4-11
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15 April 1999 (1999-04-15)	2
Y	the whole document	4-11
X	SEEDORF K ET AL: "HUMAN PAPILLONMAVIRUS TYPE 16 DNA SEQUENCE" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 145, no. 1, 1 August 1985 (1985-08-01), pages 181-185, XP002059799 ISSN: 0042-6822	2
Y	abstract; figure 3; table 1 -& DATABASE EMBL 'Online! 18 June 1997 (1997-06-18) retrieved from EBI Database accession no. AF001600 XP002202894 abstract -& DATABASE SWALL 'Online! 21 July 1986 (1986-07-21) retrieved from EBI Database accession no. P03107 XP002202895 abstract	4
A	US 6 114 148 A (HAAS JURGEN ET AL) 5 September 2000 (2000-09-05) the whole document	1-4
A	WO 00 14244 A (GAJEWCZYK DIANE M ;ROVINSKI BENJAMIN (CA); CONNAUGHT LAB (CA); PER) 16 March 2000 (2000-03-16) the whole document	11
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9 June 1994 (1994-06-09) the whole document	1-4

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int pplication No
 PCT/DE 01/03618

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01 14416 A (CHEN LING ;MERCK & CO INC (US); SCHULTZ LOREN D (US); WANG XIN MIN) 1 March 2001 (2001-03-01) the whole document & DATABASE GSN 'Online! 14 May 2001 (2001-05-14) retrieved from EBI Database accession no. AAF75383 abstract	1-11
P,X	DATABASE EMBL 'Online! 5 December 2000 (2000-12-05) retrieved from EBI Database accession no. AF322411 XP002202896 abstract	1-3
P,X	DATABASE EMBL 'Online! 16 August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313180 XP002202897 abstract	1-3
P,X	DATABASE EMBL 'Online! 16 August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313181 XP002202898 abstract	1-3
P,X	DATABASE EMBL 'Online! 16 August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313179 XP002202899 abstract	4
P,X	DATABASE EMBL 'Online! 5 December 2000 (2000-12-05) retrieved from EBI Database accession no. AF322413 XP002202900 abstract	4
T	LEDER C ET AL: "Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes." JOURNAL OF VIROLOGY. UNITED STATES OCT 2001, vol. 75, no. 19, October 2001 (2001-10), pages 9201-9209, XP002202893 ISSN: 0022-538X the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No
PCT/DE 01/03618

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9902694	A	21-01-1999	AU 747522 B2 AU 8199998 A WO 9902694 A1 EP 1002091 A1 JP 2001509388 T	16-05-2002 08-02-1999 21-01-1999 24-05-2000 24-07-2001
CA 2229955	A		NONE	
WO 9918220	A	15-04-1999	US 6228368 B1 AU 9684698 A BR 9814606 A CA 2305382 A1 EP 1021547 A1 HU 0004360 A2 JP 2001519161 T NO 20001768 A PL 339735 A1 TR 200001842 T2 WO 9918220 A1	08-05-2001 27-04-1999 02-01-2002 15-04-1999 26-07-2000 28-03-2001 23-10-2001 02-06-2000 02-01-2001 21-12-2000 15-04-1999
US 6114148	A	05-09-2000	AU 737122 B2 AU 4355697 A CN 1237977 A CZ 9900968 A3 EP 0929564 A1 HU 9904239 A2 JP 2001503252 T PL 332431 A1 TR 9900624 T2 WO 9812207 A1	09-08-2001 14-04-1998 08-12-1999 15-09-1999 21-07-1999 28-04-2000 13-03-2001 13-09-1999 21-07-1999 26-03-1998
WO 0014244	A	16-03-2000	AU 5611899 A WO 0014244 A2 EP 1108035 A2 US 6235523 B1	27-03-2000 16-03-2000 20-06-2001 22-05-2001
WO 9412632	A	09-06-1994	WO 9412632 A1	09-06-1994
WO 0114416	A	01-03-2001	AU 7063900 A EP 1212358 A2 WO 0114416 A2	19-03-2001 12-06-2002 01-03-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/DE 01/03618

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/37 C12N15/84 C12N15/85 C12N5/10 C07K14/025
A61K39/12 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 02694 A (ZHOU JIAN ;FRAZER IAN (AU); UNIV QUEENSLAND (AU)) 21. Januar 1999 (1999-01-21)	1-3
Y	Seite 15, Zeile 23 -Seite 29, Zeile 23; Abbildungen 2,3; Beispiele 1-3,8; Tabelle 1	4-11
X	ZHOU JIAN ET AL: "Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 73, Nr. 6, Juni 1999 (1999-06), Seiten 4972-4982, XP002164427 ISSN: 0022-538X	1-3
Y	das ganze Dokument	4-11

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte enzeichen
PCT/DE 01/03618

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CA 2 229 955 A (MEDIGENE AG) 20. August 1999 (1999-08-20)	2
Y	Seite 4, Zeile 9 -Seite 6, Zeile 7; Beispiel 1; Tabelle 1 & DATABASE GSN 'Online! 14. März 2000 (2000-03-14) retrieved from EBI Database accession no. AAZ48174 Zusammenfassung & DATABASE GSP 'Online! 14. März 2000 (2000-03-14) retrieved from EBI Database accession no. AAY57720 Zusammenfassung	4-11
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15. April 1999 (1999-04-15)	2
Y	das ganze Dokument	4-11
X	SEEDORF K ET AL: "HUMAN PAPILLONMAVIRUS TYPE 16 DNA SEQUENCE" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, Bd. 145, Nr. 1, 1. August 1985 (1985-08-01), Seiten 181-185, XP002059799 ISSN: 0042-6822	2
Y	Zusammenfassung; Abbildung 3; Tabelle 1 -& DATABASE EMBL 'Online! 18. Juni 1997 (1997-06-18) retrieved from EBI Database accession no. AF001600 XP002202894 Zusammenfassung -& DATABASE SWALL 'Online! 21. Juli 1986 (1986-07-21) retrieved from EBI Database accession no. P03107 XP002202895 Zusammenfassung	4
A	US 6 114 148 A (HAAS JURGEN ET AL) 5. September 2000 (2000-09-05) das ganze Dokument	1-4
A	WO 00 14244 A (GAJEWCZYK DIANE M ;ROVINSKI BENJAMIN (CA); CONNAUGHT LAB (CA); PER) 16. März 2000 (2000-03-16) das ganze Dokument	11
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9. Juni 1994 (1994-06-09) das ganze Dokument	1-4

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte ktenzelchen

PCT/DE 01/03618

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P,X	WO 01 14416 A (CHEN LING ;MERCK & CO INC (US); SCHULTZ LOREN D (US); WANG XIN MIN) 1. März 2001 (2001-03-01) das ganze Dokument & DATABASE GSN 'Online! 14. Mai 2001 (2001-05-14) retrieved from EBI Database accession no. AAF75383 Zusammenfassung	1-11
P,X	--- DATABASE EMBL 'Online! 5. Dezember 2000 (2000-12-05) retrieved from EBI Database accession no. AF322411 XP002202896 Zusammenfassung	1-3
P,X	--- DATABASE EMBL 'Online! 16. August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313180 XP002202897 Zusammenfassung	1-3
P,X	--- DATABASE EMBL 'Online! 16. August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313181 XP002202898 Zusammenfassung	1-3
P,X	--- DATABASE EMBL 'Online! 16. August 2001 (2001-08-16) retrieved from EBI Database accession no. AJ313179 XP002202899 Zusammenfassung	4
P,X	--- DATABASE EMBL 'Online! 5. Dezember 2000 (2000-12-05) retrieved from EBI Database accession no. AF322413 XP002202900 Zusammenfassung	4
T	--- LEDER C ET AL: "Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes." JOURNAL OF VIROLOGY. UNITED STATES OCT 2001, Bd. 75, Nr. 19, Oktober 2001 (2001-10), Seiten 9201-9209, XP002202893 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter
PCT/DE 01/03618

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9902694 A	21-01-1999	AU 747522 B2 AU 8199998 A WO 9902694 A1 EP 1002091 A1 JP 2001509388 T	16-05-2002 08-02-1999 21-01-1999 24-05-2000 24-07-2001
CA 2229955 A		KEINE	
WO 9918220 A	15-04-1999	US 6228368 B1 AU 9684698 A BR 9814606 A CA 2305382 A1 EP 1021547 A1 HU 0004360 A2 JP 2001519161 T NO 20001768 A PL 339735 A1 TR 200001842 T2 WO 9918220 A1	08-05-2001 27-04-1999 02-01-2002 15-04-1999 26-07-2000 28-03-2001 23-10-2001 02-06-2000 02-01-2001 21-12-2000 15-04-1999
US 6114148 A	05-09-2000	AU 737122 B2 AU 4355697 A CN 1237977 A CZ 9900968 A3 EP 0929564 A1 HU 9904239 A2 JP 2001503252 T PL 332431 A1 TR 9900624 T2 WO 9812207 A1	09-08-2001 14-04-1998 08-12-1999 15-09-1999 21-07-1999 28-04-2000 13-03-2001 13-09-1999 21-07-1999 26-03-1998
WO 0014244 A	16-03-2000	AU 5611899 A WO 0014244 A2 EP 1108035 A2 US 6235523 B1	27-03-2000 16-03-2000 20-06-2001 22-05-2001
WO 9412632 A	09-06-1994	WO 9412632 A1	09-06-1994
WO 0114416 A	01-03-2001	AU 7063900 A EP 1212358 A2 WO 0114416 A2	19-03-2001 12-06-2002 01-03-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.